



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00859

(22) Data de depozit: 18/11/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• RĂUT IULIANA, ALEEA BARAJUL  
BISTRIȚA NR.12, BL.4, ET.4, AP.54,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• SESAN TATIANA EUGENIA,  
BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,  
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,  
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,  
B, RO;  
• DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU NR.  
4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• STOICA RUSANDICA,  
STR. CPT. DECUSEARĂ NR. 10A, BL. E2B,  
SC. 1, AP. 9, TECUCI, GL, RO;  
• JECU MARIA-LUIZA,  
STR. PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR. 8,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE CREȘTERE A TOLERANȚEI LA USCARE  
ȘI REACTIVARE PRIN REHIDRATARE A TULPINILOR  
BIOSTIMULANTE DE TRICHODERMA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biostimulant pentru tratamentul și colonizarea resturilor vegetale care acoperă solul în sistemele de agricultură conservativă. Procedeu conform invenției constă în cultivarea axenică a tulpinilor de *Trichoderma* pe un mediu care conține glicin-betaină și dioxid de siliciu coloidal, la pH de 5,5, și la aerări care asigură 1...5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, la o temperatură de incubare ce variază cu un interval de 10°C, 12 h la 20°C și 12 h la 30°C, timp de 5 zile,

recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum, amestecarea biomasei cu suc proaspăt de grâu, având un conținut total de polifenoli de minimum 2 mg, echivalent acid galic per gram, și uscarea amestecului până la maximum 5% umiditate reziduală, din care rezultă un produs cu activitate de degradare a materialului vegetal.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## PROCEDEU DE CREȘTERE A TOLERANȚEI LA USCARE ȘI REACTIVARE PRIN REHIDRATARE A TULPINILOR BIOSTIMULANTE DE *TRICHODERMA*

Prezenta invenție se referă la un procedeu de creștere a toleranței la uscare și la reactivare prin rehidratare a tulpinilor biostimulante de *Trichoderma*, în special a celor destinate tratamentului și colonizării resturilor vegetale care acoperă solul în sistemele de agricultură conservativă.

Sunt cunoscute diferite procedee de creștere a toleranței la uscare, destinate tulpinilor de microorganisme benefice plantelor de cultură care nu prezintă forme de răspândire cu o (termo)rezistență ridicată, cum sunt de exemplu bacteriile gram-negative sau ciupercile microscopice. Formulările uscate de microorganisme benefice plantelor de cultură (ca de ex. pulberile umectabile) sunt cele mai convenabile sub raportul aplicării practice, datorită termenului ridicat de valabilitate, condițiilor normale de păstrare și compatibilității cu sistemele uzuale de aplicare.

O serie de brevete descriu utilizarea unei matrici de polizaharide / hidrocoloizi pentru traparea microorganismelor și protejarea lor ulterioară față de destructurarea sistemelor celulare, rezultată în timpul procesului de uscare. Celulele vegetative de fixatori de azot simbiotici din grupul *Rhizobium* (care nu prezintă forme de răspândire cu rezistență ridicată la factorii adversi de mediu) au fost incluse într-un gel polimeric, format din gumă xantan, făină din fructe de roșcove (carub) și alginat, căruia i s-a redus activitatea apei prin uscare la aproape 0,1 (Brevet EP 0083267 B1). Alginatul, în concentrație de până 10%, a fost folosit, împreună cu ulei (ulei de soia, ulei mineral sau ulei de rapiță) și cu un agent emulsifiant, pentru a menține viabilitatea microorganismelor agro-inoculante / benefice plantelor din genurile *Pseudomonas*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* (brevet CA 1300538 C). Hidrocoloizi ca alginat, agaroză, pectină slab metilată, alcool polivinilic, carageenan sau xantan plus făină de carub, împreună cu un crio-protectant care include glicerol în proporție de 10 la 50% din masa hidrocoloidului, au fost utilizați pentru condiționarea diferitelor tulpini de microorganisme benefice plantelor de cultură, inclusiv de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum* sau *Trichoderma viride*. (Brevet SUA 7422737). Celulele vegetative din tulpini antagoniste de *Gliocladium virens*, *Penicillium oxalicum*, *Talaromyces flavus*

*Trichoderma viride* au fost formulate prin închidere / încapsulare în granule de alginat de calciu, urmată de uscarea lentă a acestora (Cererea de brevet US 4818530 A). Tulpina Td50b de *Trichoderma harzianum* a fost inclusă într-o matrice de făină de rumeguș parțial hidrolizat și făină de orz și apoi uscată lent (Cerere de brevet EP 2735607 A1). Uneori hidrocoloizii naturali de tipul polizaharidelor sunt utilizați împreună cu suporturi absorbante anorganice. Cererea de brevet FR 2501716 A1 descrie utilizarea silicei precipitate cu: o suprafață specifică sub 150, preferabil 80-120, m<sup>2</sup> per g; cu o capacitate de absorbție de ulei de peste 200, preferabil 250-450, ml la 100 g; volumul porilor (prin porozimetrie cu mercur), pentru pori mai mici decât 1000, preferabil 500, angstromi, de cel puțin 70 ml per 100 g, ca suport pentru microorganismele agro-inoculante, în special *Rhizobium*, împreună cu un gel polimeric, pe bază de xantan și făină din fructe de roșcove (carub). Alți hidrocoloizi utilizați pentru protecția bacteriilor din grupul *Rhizobium* sunt cei sintetici, ca de exemplu polimerul super-adsorbant poliacrilat de sodiu – poliacrialamida, folosit pentru protecția la uscare a rhizobiilor în combinație cu trehaloza (Brevet RO 123144 B1). Cererea de brevet EP3082416 A1 revendică utilizarea a diferitelor tipuri de polimeri super-adsorbanti, inclusiv anorganici de tipul filo-silicaților, împreună cu microorganisme benefice plantelor de cultură. Printre obiectivele urmărite prin realizarea amestecurilor de polimeri super-adsorbanti cu microorganismele benefice sunt și cele care țin de creșterea ratei de supraviețuire și de eficiență după aplicare. Nu sunt descrise însă obiective ale acestui brevet asociate creșterii toleranței la uscare sau explicit creșterii ratei de supraviețuire la reactivarea prin rehidratare.

În alte procedee tulpinile de microorganisme benefice plantelor de cultură sunt cultivate în mediu semi-solid, în condiții care să favorizeze acumularea unor forme cu o rezistență mai mare la factorii de mediu adversi, ca de ex. conidiile aeriene. Mediul semisolid se usucă împreună cu biomasa de microorganisme, inclusiv formele de răspândire / propagule. La aplicare propagulele se re-hidratează și se reactivează. Cererea de brevet CN105586279 A descrie un procedeu de obținere a biopreparatelor pe bază de *Trichoderma* prin cultivare pe paie de grâu și hidrolizat proteic. Brevetul SUA 5 422 107 prezintă tulpina SK-55 de *Trichoderma harzianum*, număr de depunere BP 4346 NIBH, Japonia. Biopreparatul pe baza acestei tulpini este destinat



pentru tratament la sol. Acest biopreparat este realizat prin cultivare septică, pe un mediu conținând tărâțe de grâu umectate la 90% apă, care este repartizat în tăvi de aluminiu. Brevetul RO 126363 B1 se referă și la un procedeu de conversie a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un biopreparat antifungice pe bază de *Trichoderma viride* Td<sub>49</sub>, care cuprinde următoarele etape: (i) trecerea a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* într-un amestecător universal; (ii) adăugarea de superfosfat în proporție de 0,4...0,5% pentru normalizarea pH-ului și a conținutului de potasiu; (iii) inocularea cu 0,1% biopreparate pe bază de *Trichoderma viride* Td<sub>49</sub>, (iv) menținerea timp de 7 .. 8 zile a compoziției de mai sus, amestecând cu o frecvență de o rotație pe oră pentru aerarea substratului.

Producerea unor forme mai rezistente la factorii de mediu, de tipul microscleroților, a fost revendicată și pentru medii lichide, cu un conținut ridicat de sursă de carbon, agitate și aerate cu un flux de aer de min 0,1 litri aer / 1 litru de mediu / min., care menține nivele de oxigen dizolvat apropiate de zero (Cererea de brevet US 20160081351 A1).

Dezavantajul procedeelor descrise mai sus constă în rata redusă de supraviețuire la uscare și mai ales la reactivare după rehidratare, care limitează capacitatea tulpinilor de *Trichoderma*, inoculate pe diferite substraturi prin aplicarea diferitelor biopreparate, de a coloniza respectivele substraturi. Formele vegetative încorporate în hidrocoloizi se rehidratează cu dificultate, pentru că hidrocoloizii au tendința de a lega moleculele de apă foarte puternic, fapt care împiedică umectarea zonelor interioare. Procesele de rehidratare sunt asociate reluării neorganizate și nestructurate a procesele metabolice oxidative, care determină generarea de specii reactive de oxigen / oxidante cu efect dăunător (Morgan et al. 2006, *Journal of Microbiological Methods*, **66**, 183-193). Ca și în cazul uscării, speciile reactive de oxigen / oxidante sunt cele care determină formarea unor leziuni care nu sunt compatibile cu activitatea metabolică coordonată a microorganismelor, analog cu ceea ce se întâmplă în timpul proceselor de ischemie și reperfuție tisulară (Cuzzocrea et al. 2001, *Pharmacological Reviews*, **53**, 135-159).

În cazul particular al tulpinilor de *Trichoderma*, formele mai rezistente la condițiile de mediu adverse, conidii, microscleroți, clamidospori, au o rată relativă redusă de germinare (Lewis și Papavizas, 1983, *Soil Biology and Biochemistry*, **16**, 1-10).



15, 351-357). Acest dezavantaj este foarte relevant pentru tulpinile biostimulante de *Trichoderma* utilizate ca tratament al resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă, pentru că întârzie și limitează colonizarea resturilor vegetale pe care sunt aplicate.

Sistemele de agricultură conservativă (CA) au o serie de avantaje, ca de ex. reducerea consumurilor de combustibil necesar pentru arătura cu întoarcerea brazdei, limitarea eroziunii și reținerea nutrienților în straturile superioare de sol. Aceste sisteme prezintă însă și o serie de dezavantaje, respectiv întârzierea dezvoltării primelor fenofaze (datorită menținerii solului rece) și favorizarea dezvoltării fitopatogenilor. Aplicarea biopreparatelor cu tulpini biostimulante de *Trichoderma* reprezintă o soluție pentru contracararea acestor dezavantaje specifice sistemelor CA. Colonizarea rapidă a resturilor vegetale de către tulpinile de *Trichoderma* limitează dezvoltarea agenților fitopatogeni (Raut et al. 2015, *Journal of Biotechnology*, **208**, S62). Efectul biostimulant compensează întârzierile datorită reducerii temperaturii solului / sumei gradelor de temperatură utile pentru dezvoltarea plantelor de cultură (Oancea et al, 2016. *Studia Universitatis Vasile Goldiș Seria Științele Vieții (Life Sciences Series)*, **26**, 251-260).

Autorii au constatat că sucul de grâu proaspăt protejează în timpul procesului de rehidratare diferitele tipuri de propagule de *Trichoderma* și favorizează reactivarea și colonizarea resturilor vegetale. Sucul de grâu proaspăt este însă un produs natural, cu o variabilitate ridicată, deci este necesară stabilirea unor valori de prag pentru o serie de caracteristici de calitate care asigură reproductibilitatea acțiunii biologice. De asemenea autorii au constat că sucul de grâu proaspăt are o eficacitate crescută atunci când este aplicat pe microorganisme care au amorsat sistemul de toleranță la factorii de stres, datorită unor factori specifici de cultivare. O astfel de amorsare a toleranței la factorii de stres este indusă de acidul silicic. Acidul silicic,  $H_4SiO_4$ , este cunoscut ca fiind un biostimulant care crește rezistența plantelor la factorii de stres (Savvas și Ntatsi, 2015 *Scientia Horticulturae*, **19**, 66–81) și ca având un efect de stimulare a creșterii microorganismelor (Wainwright et al. 1997, *Mycological Research*, **101**, 933-938).

Acidul ortosilicic este însă un acid foarte slab, cu patru funcțiuni acide la care valoarea pKa cea mai mică este de 9,8 (Iler, *The Chemistry of Silicon*



Wiley & Sons, New York, 1979, pg. 207). Aceasta înseamnă că la pH 9,8 acidul ortosilicic este prezent 50% în stare nedisociată și 50% în stare disociată. Între valorile de pH 2 și 8 acidul ortosilicic este o moleculă neutră, complet nedisociată. La concentrații mai mari de 2 mM începe să polimerizeze, prin reacții de policondensare, cu eliberare de apă (McIntosh, 2012, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14: 996-1013). Datorită acestei tendințe de policondensare acidul ortosilicic nu poate fi inclus în mediile de cultură ale microorganismelor în concentrații mari, ci trebuie să fie eliberat constant în concentrații mici, biologic active, din compuși precursori.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a se realiza un procedeu prin care să se realizeze: creșterea rezistenței formelor vegetative la uscure; amorsarea mecanismelor interne de rezistență la factorii de stres; creștere a ratei de reactivare după rehidratare, atât a formelor vegetative, cât și a formelor cu rezistență mai ridicată la factorii adverși de mediu, conidii, microscleroți, clamidospori.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Cultivarea axenică a tulpinilor biostimulante de *Trichoderma*, pe mediu extract de cartof - glucoză, care include 50 mg/l glicin-betaină și 2% dioxid de siliciu coloidal, la pH optim și la aerări care asigură între 1 și 5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C, timp de 5 zile;
- Recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar;
- Amestecarea biomasei de microorganisme cu suc proaspăt de grâu, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme din genul *Trichoderma* la 10 părți suc proaspăt de grâu;
- Uscarea biomasei de microorganisme, a sucului proaspăt de grâu și a siliciului coloidal, până la max. 5% umiditate reziduală.

Sucul proaspăt de grâu folosit are un conținut total de polifenoli de min. 2 mg echivalent acid galic per gram și o activitate antioxidantă în testul DPPH, hidrat de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, de min 1,1 mg echivalent trolox per g.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Creșterea toleranței la uscure a formelor vegetative, datorită efectului protector exercitat de glicin-betaină și de polifenolii antioxidanți din suc



grâu, combinat cu amorsarea mecanismelor de rezistență sub efectul fluxului de acid ortosilicic și al șocurilor de temperatură și de aerare;

✓ Creșterea toleranței la reactivare prin rehidratare datorită efectului protector anti-oxidant complementar exercitat de glicin-betaină și de antioxidanții din suc de grâu;

✓ Adaptarea rapidă a propagulelor tulpinilor reactivate la micro-biotopul specific resturilor vegetale, datorită biodisponibilității crescute a unor compuși specifici materialului vegetal în suc de grâu proaspăt.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

*Exemplu 1.* Într-un bioreactor (Biostat® B, Goettingen, Germania), prevăzut cu senzor de pH și senzor de oxigen dizolvat (DO) (InPro6800; Mettler-Toledo AG, Greifensee, Elveția), prevăzut cu un vas de 5 litri, se aduc 2 litri mediu (decoct de) cartof – glucoză. Decoctul de cartof se prepară prin fierbere timp de 30 min a 400 g de cartofii, feliați și necurățați de coajă în circa 2 litri apă distilată. Se separă prin strecurare prin tifon decoctul, se adaugă în acest decoct 40 g glucoză și se aduce la 2 litri. Se suspendă în mediul rezultat 40 g de dioxid de siliciu coloidal, care are o suprafață specifică BET cuprinsă între 270 și 330 m<sup>2</sup>/g, un conținut de bioxid de siliciu de min. 98% și care generează suspensii cu un pH de 5,5. Mediul rezultat se sterilizează prin autoclavare *in-situ*. Se verifică pH-ul și se aduce la pH 5,5 cu HCl 1 M sau NaOH 1 M. Toți reactivi folosiți sunt proveniți de la Merck-Millipore, Darmstadt, Germania, cu excepția dioxidului de siliciu coloidal, care este Aerosil® 300 Pharma (Evonik Resource Efficiency, Hanau-Wolfgang, Germania). Orice alți reactivi care au aceleași caracteristici tehnice pot fi utilizați.

Mediul se inoculează cu 100 ml de suspensie de conidii de *Trichoderma asperellum* Td36b, NCAIM P(F) 001434, normalizate la 10<sup>8</sup> propagule per ml prin numărare la lamela citometrică. Tulpina *T. asperellum* Td36b este cunoscută ca având efect de biostimulare a plantelor de cultură (Raut et al. 2015. *Journal of Biotechnology*, **208**, S62). Se cultivă tulpina Td36b timp de 5 zile, la o rată de aerare de 0,1 – 0,15 litri de aer per litru de mediu per min., care asigură între 1 și 5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, cu varierea zilnică a temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C.



27

Din oră în oră se prelevează aseptice probe de 2- 2,4 ml mediu de cultură cu microorganisme, în vase din HDPE (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Se separă prin centrifugare supernatantul, de sedimentul microbial și de gelul de silice, și se preiau probe de câte 1 ml de supernatant, care este diluat cu 4 ml apă ultrapură, în tuburi Eppendorf conice de 15 ml (Eppendorf, Hamburg, Germania). Conținutul de acid ortosilicic liber este determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Acest test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația absolută de acid silicic este calculată după construcția unei curbe de calibrare, folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). În mediu de cultură se determină o concentrație de acid ortosilicic care este permanent de sub 1 mM, fiind consecința a două procese concomitente – solubilizarea siliciului sub efectul metabolismului microbial și asimilarea acidului ortosilicic. În sedimentul de microorganisme se determină siliciul total, după mineralizare, prin ICP-OES (Georgiadis et al. 2013, *Geoderma*, 209: 251-261). Se constată o continuă creștere a conținutului de siliciu în biomasa de microorganisme, creștere care dovedește asimilarea acidului ortosilicic de către microorganisme. Fluxul de acid (orto)silicic prin citoplasmă și depozitarea acestuia în structurile parietale este considerat ca fiind cel care determină amorsarea mecanismelor de toleranță la plante (Guerriero et al. 2016, *Frontiers in Plant Science*, 7, 463), iar acest mecanism se pare că este unul comun, care se regăsește și la microorganisme.

După terminarea perioadei de cultivare se recoltează biomasa de microorganisme și dioxidul de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar, folosind o unitate Sartolab® (Sartorius, Goettingen, Germania). Gelul rezultat prin filtrare conține 5 grame biomasă *Trichoderma* și este resuspendat cu 50 ml suc de grâu proaspăt. Sucul de grâu este preparat conform metodei recent descrise (Stoica et al. 2016, *Revista de Chimie*, 67, 1669-1672). Acest suc proaspăt de grâu are un conținut total de polifenoli de min. 2 mg echivalent acid galic per gram și o activitate antioxidantă în testul DPPH, hidrat de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, de min 1,1 mg echivalent trolox per g. Determinările acestor caracteristici sunt realizate conform metodei descrise în lucrarea citată mai sus (Stoica et al. 2016, *Revista de Chimie*, 67, 1669-1672).





1672). Se completează volumul în care este resuspendat gelul de silice, biomasa de *Trichoderma*, sucul de grâu proaspăt, la 250 ml cu apă pură miliQ (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-Millipore). Suspensia rezultată se usucă până la max. 5% umiditate reziduală, pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 130-140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 75...80°C. O instalație de uscare prin pulverizare care poate fi utilizată în acest scop este de exemplu Niro Production Minor Unit, produsă de Niro Gea (Soeborg, Danemarca) sau Laboratory spray dryer, produsă de ICF Cibec (Maranello, Italia). Orice alt tip de instalație de uscare prin pulverizare, cu caracteristici tehnice similare, poate fi utilizată.

*Exemplul 2.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, numai că se folosește tulpina *Trichoderma harzianum* Td50b, NCAIM (P) F 001412, care are caracteristici de biostimulant pentru plante (EP 2735607 A1).

*Exemplu 3.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, numai că se folosește tulpina *Trichoderma viride* Tv 82, care are caracteristici de biostimulant pentru plante (Şesan et al. 2015. *Acta Horti Botanici Bucurestiensis*, **42**, 63-66).

*Exemplu 4.* Pentru evidențierea capacității de colonizare și degradare a materialului vegetal s-a realizat un experiment prin care s-a urmărit consumul de oxigen și eliberarea diferiților compuși din material vegetal tratat cu tulpinile de *Trichoderma* biostimulante utilizate în cadrul exemplelor 1-3 și cu biopreparate obținute prin aplicarea procedurii conform invenției – exemplele 1-3. Materialul vegetal (fân de măzăriche păroasă) a fost măcinat și trecut pe sita de 0,250 mm. S-au ambalat câte 10 g de pulbere care s-au sterilizat prin iradiere gamma (la IRASM, IFIN, București). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 1 g de pulbere de material vegetal, care s-au adus aseptice într-un Erlenmayer de 50 ml, steril. Peste pulberea fin măcinată s-a adăugat 1 ml suspensie microbiană, normalizată la  $10^8$  propagule per ml, prin numărare citometrică. Suspensia era provenită din liofilizatele ale tulpinilor biostimulante de *Trichoderma* folosite în cadrul exemplelor de mai sus, crescute pe mediu cartof - glucoză sau din biopreparate rezultate prin aplicarea procedurii conform invenției. Probele material vegetal – inocul fungic au fost menținute la termostat timp de 120 ore, la temperatura de 28°C, după care s-a trecut aseptice



*[Handwritten signature]*

25

într-un vas de respirație Strathox (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Marea Britanie). S-au efectuat determinările de respirație / producere de bioxid de carbon timp de 12 ore. După efectuarea determinărilor de respirație s-au separat prin centrifugare supernatantele, în care s-a determinat Carbonul Organic Total (TOC) cu un aparat Formacs HT (Skalar Analytical B.V., Breda Olanda), glucidele reducătoare (cu reactiv DNS) și fosforul solubil total (cu molibdat de amoniu și reactiv clorostanic). Probele au fost analizate comparativ cu un martor neinoculat - martor negativ. Acest martor conferă informații referitoare la comportamentul unor probe ideale, fără activitate biologică de degradare a substratului vegetal. În această variantă, substratul vegetal nu a fost inoculat cu microorganisme și a fost menținut în condiții identice de incubare cu cele ale probelor test. Acesta oferă informații referitoare la cantitatea maximă de oxigen care ar putea fi consumată în probe fără activitate de biodegradare externă, datorită proceselor reziduale enzimatic interne.

Rezultatele sunt prezentate în tab. 1 de mai jos. Aceste rezultate demonstrează că procedeul conform invenției crește semnificativ toleranța la uscare și la reactivare prin rehidratare, cu efecte evidente în ceea ce privește rata de colonizare și degradare a materialului vegetal.

Tab. 1. Activitatea de degradare a materialului vegetal de către tulpinile biostimulante de *Trichoderma*, rehidratate după diferite procedee de uscare, respectiv liofilizare sau procedeu realizat conform invenției.\*

Tulpina, proces de uscare	Respirație (mg/l O <sub>2</sub> consumați, medie orară)	Conținut de carbon organic total în supernatant (mcg/l)	Glucide solubile (mcg/l)	Fosfor solubil (mcg/l)
Td36b, liofilizare	1,42±0,22b	4,23±1,21b	11,82±0,47b	18,27±1,52b
Td36 b, conf. Ex. 1	2,28±0,16a	7,62±1,27a	28,42±0,84a	37,73±4,12a
Td50b, liofilizare	1,52±0,09b	4,42±1,03b	12,41±0,61b	16,82±1,32b
Td50b, conf. Ex.2	2,17±0,07a	7,54±2,02a	28,77±0,63a	35,41±3,24a
Tv 82, liofilizare	0,81±0,12c	3,43±0,27c	5,67±0,68c	7,24±0,94c
Tv 82, conf. Ex. 3	1,87±0,21ab	5,89± 3,16ab	22,24±0,82ab	18,87±1,17b

\*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05.



### Revendicări

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea** că este alcătuit din următoarele etape: cultivarea axenică a tulpinilor biostimulante de *Trichoderma*, pe mediu extract de cartof - glucoză, care include 50 mg/l glicin-betaină și 2% dioxid de siliciu coloidal, la pH optim și la aerări care asigură între 1 și 5% saturație din nivelul maxim de oxigen dizolvat, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C, timp de 3-5 zile; recoltarea biomasei de microorganisme și a dioxidului de siliciu coloidal rezidual prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar; amestecarea biomasei de microorganisme cu suc proaspăt de grâu, în raport de 1 parte biomasă de microorganisme din genul *Trichoderma* la 10 părți suc proaspăt de grâu; uscarea biomasei de microorganisme, a sucului proaspăt de grâu și a siliciului coloidal, până la max. 5% umiditate reziduală.
2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea** că sucul proaspăt de grâu folosit are un conținut total de polifenoli de min. 2 mg echivalent acid galic per gram și o activitate antioxidantă în testul DPPH, hidrat de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, de min 1,1 mg echivalent trolox per g.



ce